

⑩ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

② Offenlegungsschrift
③ DE 199 40 415 A 1

④ Int. CL⁷:
A 23 L 1/30

① Anmelder:
Spener, Friedrich, Prof. Dr., 48149 Münster, DE

② Erfinder:
Spener, Friedrich, Prof. Dr., 48147 Münster, DE;
Wolfrum, Christian, Dipl.-Chem., 48149 Münster,
DE

⑤ Entgegenhaltungen:
WO 99 20 722
Chem. Abstr. 130, 265265z (1999);
Chem. Abstr. 128, 304760m (1998);
Römpf, Lexikon chemie, 10.Aufl., 1999, Georg
Thieme Verlag, Stuttgart, Bd.4, S.3332;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen
Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

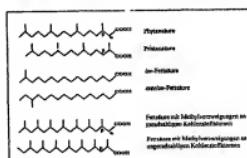
⑥ Verzweigkettige Fettsäuren als fettabbauende Wirkstoffe

⑦ Die vorliegende Erfindung betrifft verzweigkettige Fettsäuren, dadurch gekennzeichnet, daß sie mit einem der Peroxisomen Proliferator aktiver Rezeptoren (PPAR) Isoformen oder strukturverwandter, ligandaktiver Kemtrezeptoren und/oder mit einem Lipidbindungsprotein vom Strukturtyp der 14-15 kDa Fettsäure-bindungsproteine, direkt wechselwirken, als Wirkstoffe mit einem fettdepotreduzierenden Effekt. Zu diesen verzweigkettigen Fettsäuren gehören die als Beispiele aufgeführten verzweigkettigen Fettsäuren vom Isoprenoïd- und Acetogenintyp. Weiterhin betrifft diese Erfindung den Einsatz dieser verzweigkettigen Fettsäuren als Zusatzstoffe zu Diätetika, Nahrungsmitteln und Genussmitteln zur Vermeidung von Übergewicht und zur Reduktion bestehender Fettdepots.

26.06.99

IPP DE 1994/151 00020

Zulassungsformular
Zulassungserklärung
② Die vorliegende Erfindung betrifft verzweigkettige Fettsäuren, die mit einem der Peroxisomen Proliferator aktiver Rezeptoren oder strukturverwandter, ligandaktiver Kemtrezeptoren und/oder mit einem Lipidbindungsprotein vom Strukturtyp der 14-15 kDa Fettsäure-bindungsproteine, direkt wechselwirken, als Wirkstoffe mit einem fettdepotreduzierenden Effekt. Zu diesen verzweigkettigen Fettsäuren gehören die als Beispiele aufgeführten Fettsäuren vom Isoprenoïd- und Acetogenintyp. Weiterhin betrifft diese Erfindung den Einsatz dieser verzweigkettigen Fettsäuren als Zusatzstoffe zu Diätetika, Nahrungsmitteln und Genussmitteln zur Vermeidung von Übergewicht und zur Reduktion bestehender Fettdepots.



Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft natürliche Fettsäuren des Isoprenoïd- und Acetogenintyps mit Methyl- und Ethylverzweigung und synthetische verzweigketige Fettsäuren als Diäteute und Zusatzstoffe zu Nahrungs- und Genussmitteln zur Förderung des Fettabbau bei Menschen.

Der Anspruch erstreckt sich auf natürliche und synthetische verzweigketige Fettsäuren, deren Struktur angepaßt ist für die Bindung dieser Fettsäuren durch Isoformen des Peroxisomen Proliferator aktivierten Rezeptors (PPAR) sowie durch Lipidbindungsproteine vom Strukturtyp der 14-15 kDa Fettsäurebindungsproteine.

Die Lipidhomöostase in Menschen und in Säugetieren wird durch die Balance zwischen Energieaufzehr (Nahrungsaufnahme) und -verbrauch reguliert. Aus diesem Grund existieren Kontrollmechanismen in Bezug auf die Verfügbarkeit von Kohlenhydraten und Fetten, ihren Transport, Stoffwechsel, Einbau und Mobilisation. Übersteigt die Energieaufzehr den Energieverbrauch so wird dieses Gleichgewicht gestört und bedingt Gewichtszunahme, deren größter Anteil auf die Bildung von Fettdepots zurückzuführen ist (Woods et al. (1998) *Science* 280, 1378-1383).

Unter die Isoformen ligandaktivierter Kernrezeptoren des PPAR Typs fallen die bis heute bekannten PPAR α , PPAR β (auch Nuc oder FAAR) und PPAR γ -2 (Wahl et al. (1999) *Adv. Exp. Med. Biol.* 447, 199-209). Der katabole Fettstoffwechsel unterliegt der Kontrolle der PPARs, die als Zielmoleküle für hypolipidämische Medikamente fungieren und über die Steuerung mehrerer Schlüsselenzyme des peroxisomalen und mitochondrialen Stoffwechsels sowie der Lipoproteincaps und verschiedenen Apolipoproteine den katabolen Fettsäurestoffwechsel in Eukaryoten transkriptionell regulieren (Hashimoto et al. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 19228-19236). Die hypolipidämischen Medikamente werden unter dem Begriff der peroxisomalen Proliferatoren zusammengefaßt. Der Name dieser Stoffe leitet sich aus der Fähigkeit ab, ausschließlich in Nagern die peroxisomale Proliferation, d. h. Größe und Menge der Peroxisomen, zu induzieren. Bezogen auf den Menschen führt die Aktivierung dieser Rezeptoren zu einer gesteigerten Expression der lipidabbauenden Enzyme, die sich zum Beispiel in einer Verringerung der Triacylglycerolkonzentration im Blut auswirkt und das Risiko einer Fettleibigkeit damit verbundenen Typ II Diabetes verringert. In jüngerer Zeit wurden geradketige Fettsäuren als natürliche Agonisten der PPARs identifiziert (Bocos et al. (1995) *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 53, 467-473).

Unter den Begriff Lipidbindungsproteine vom Strukturtyp der 14-15 kDa Fettsäurebindungsproteine (FABPs) fallen die bis heute bekannten 19 Mitglieder dieser Familie, die ein Strukturmotiv bestehend aus zwei orthogonalen β -Faltblättern sowie zwei α -Helixen aufweisen (Hobohoff und Speer (1998) *Fett/Lipid* 100, 252-263). Diese Proteine binden geradketige Fettsäuren, manche Vertreter binden jedoch auch die hypolipidämischen Medikamente. Den erstmals 1972 beschriebenen Proteinen (Ockner et al. (1972) *Science* 177, 56-58) wird eine Rolle im intrazellulären Fettsäuretransport und Fettstoffwechsel einerseits und in der Regulation von Genen des Fettsäurewechsels anderseits zugeschrieben (Glatz et al. (1995) *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 52, 121-127). Unsere Untersuchungen haben ergeben, daß die Lipidhomöostase durch die PPAR-vermittelte Genregulation durch Interaktion des Rezeptors und Lipidbindungsprotein sowie durch Interaktion beider Proteine mit geradketigen Fettsäuren beeinflußt werden kann.

Erstmalis konnten wir nun zeigen, daß die Lipidhomöostase auf die verzweigketige Phytansäure äußerst empfind-

lich reagiert (Ellinghaus et al. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 2766-2772). Dabei fungieren die Fettsäurebindungsproteine als cytosolische Diskriminator- und Transportproteine für die PPAR-Agonisten in den Kern, die dort über PPAR Transaktivierung die Genexpression der Enzyme des katabolen Fettsäurewechsels steuern. Die Erfindung erstreckt sich auf verzweigketige Fettsäuren, die über diesen Mechanismus die ligandaktivierten Kernrezeptoren besser transaktivieren als gesättigte und ungesättigte geradketige Fettsäuren und daher einen verstärkten Abbau der Fettdepots bewirken. In pathologisch hohen Konzentrationen von Phytansäure in Serum und Lebern, wie in sterol carrier protein 2 defizienten Mäusen gezeigt, kommt es sogar zu einem Totalabbau der Fettdepots (Sedorff et al. (1998) *Genes Dev.* 12, 1189-1201). Bei Patienten mit bestimmten genetischen Stoffwechseldefekten, wie z. B. dem Refsum-Syndrom, kann der Spiegel der Phytansäure bei 1,3 mM liegen und langfristig neurologische Schäden bedingen (Kahle et al. (1994) *Klin. Wochenschr.* 42, 1011-1018). Die verzweigketigen Fettsäuren sind jedoch als Minorkomponenten Bestandteil der menschlichen Nahrung, beispielweise beträgt der Phytansäurespiegel im Serum Gesunder zwischen 0,5 und 10 μ M.

Zu den natürlich vorkommenden, verzweigketigen Fettsäuren gehören Isoprenoïdfettsäuren, wie die Phytansäure und Pristansäure, Acetogenin-abgeleitete Fettsäuren wie iso- und anteiso-Fettsäuren und die von der Uropigialdrise der Vögel sezernierten Fettsäuren (Jacob und Ziswiler (1982) *Avian Biology* 6, 199-314), einschließlich der α - und β -Oxidationsprodukte aller verzweigketigen Fettsäuren sowie sie von den Kernrezeptoren und Lipidbindungsproteinen gebunden werden. Verzweigketige Fettsäuren die von der Uropigialdrise produziert werden, haben Methyl- und Ethylverzweigungen in variierender Anzahl an ungeradzahligen oder geradzähligen Kohlenstoffatomen der Fettsäurekette.

Beispiele für verzweigketige Fettsäuren, die für die Erforschung relevant sind, sind in Abb. 1 dargestellt.

Der Anspruch bezieht sich auf den Einsatz der verzweigketigen Fettsäuren in reiner Form, als Mischung mehrere verzweigketiger Fettsäuren und als Proform. Zu letzteren zählen metabolische Vorstufen, die im Organismus zum Wirkstoff umgewandelt werden, zum Beispiel Phytol zu Phytansäure, und in Estern gebundene verzweigketige Fettsäuren, aus denen der Wirkstoff im Organismus freigesetzt wird, zum Beispiel aus Triacylglycerinen.

Die Erfindung wird nun weiter mit Bezug auf die nachfolgenden Beispiele beschrieben.

Beispiel 1

Das Transaktivierungspotential der Fettsäuren und Medikamente für PPARs und damit für die Kapazität, fettabbauende Enzyme verstärkt zu induzieren, wird in Transaktivierungssassays deutlich. Immortalisierte humane Leberzellen (HepG2) wurden mit einem PPAR α -sensitiven CAT-Reporter, einem Expressionsvektor für humanen PPAR α und einem β -Gal Normierungsvektor transient transfiziert und mit den in Abb. 2 bezeichneten Agonisten für 24 h inkubiert. Die CAT- und β -Gal-Konzentration wurde jeweils durch ELISAs bestimmt, das Verhältnis beider Werte spiegelt die PPAR α -Transaktivierung wider. Das Ergebnis zeigt, daß die verzweigketige Phytansäure und Pristansäure den humanen PPAR α etwa 2-4 mal stärker als die geradketigen Fettsäuren transaktivieren. Im Vergleich zum potentiellen hypolipidämischen Medikament Bezafibrat liegt die Aktivierungskapazität der Pristansäure etwa doppelt so hoch (Abb. 2).

Beispiel 2

Wir zeigen in Abb. 3, daß neben PPAR das Fettsäurebindungsprotein ebenfalls ein Zielmolekül für PPAR-Agonisten ist, da die Aktivierung von der intrazellulären Konzentration an Fettsäurebindungsprotein, das die Agonisten ebenso bindet, abhängt. HepG2-Zellen, die stabil mit antisense Leber (L-)FABP transzisiert wurden, haben je nach Klon einen geringeren L-FABP Gehalt als normale HepG2-Zellen. Diese Zellklone wurden wie unter Beispiel 1 beschrieben transfiziert, mit verzweigt- und geradketten Fettsäuren für 24 h inkubiert und die CAT-, β-Gal- und L-FABP-Konzentration durch ELISAs bestimmt. Die beobachtete positive Korrelation von PPAR α -Aktivierung und intrazellulärer L-FABP-Konzentration beweist, daß L-FABP am Transport der Agonisten zum Kernrezeptor PPAR α beteiligt ist (Abb. 3), eine Extrapolation auf den Nullwert der L-FABP Konzentration ergibt, daß ohne L-FABP keine PPAR α -Aktivierung durch Agonisten möglich ist. Auch dieses Beispiel zeigt, daß verzweigketige Fettsäuren das höhere Transaktivierungspotential als geradketige Fettsäuren besitzen.

Beispiel 3

In vivo Untersuchungen an der Maus weisen die Bedeutung der verzweigketigen Fettsäuren für die Genexpression und die Gewichtsabnahme nach. Mäusen wurden mit Normalfutter, dem 0,5 Gew.-% Pristansäure zugesetzt wurde, für 2 Wochen ad libitum gefüttert und das Gewicht dieser Mäuse kontrolliert. Nach der Flitterung wurde die RNA aus der Leber isoliert und der Gehalt der mRNAs für die Enzyme des peroxisomalen katabolen Fettsäurestoffwechsels, der Acyl-CoA-Oxidase (ACO), des peroxisomalen bifunktionellen Enzyms (PBE) sowie der peroxisomalen Thiolase (pTHOL) durch Northern-Blotting quantifiziert, normalisiert auf die steige Expression der mRNA für Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH). Es zeigt sich eine 2-4fach Anstieg in der mRNA-Konzentration der untersuchten Enzyme (Abb. 4) in der Leber der mit Pristansäure-Zusatz gefütterten Mäuse. Zusätzlich zu dem Effekt auf die Enzyme war nach Fütterung dieser Fettsäure bei den Mäusen einen Gewichtsverlust von 2%, einhergehend mit einer teilweisen Reduktion des Fettgewebes zu beobachten. Dieser Versuch zeigt direkt am Organismus den Einfluß der verzweigketigen Fettsäuren auf den katabolen Lipidstoffwechsel.

Patentansprüche

- Natürliche isoprenoid- und acetogeninabgeleitete Fettsäuren mit Methyl- oder Ethylverzweigung, dadurch gekennzeichnet, daß sie mit einem der PPAR Isoformen und/oder mit einem Lipidbindungsprotein vom Strukturtyp der 14-15 kDa Fettsäurebindungsproteine, direkt wechselwirken.
- Synthetische Fettsäuren mit Verzweigungsmustern, die natürlich nicht vorkommen, dadurch gekennzeichnet, daß sie mit einem der PPAR Isoformen und/oder mit einem Lipidbindungsprotein vom Strukturtyp der 14-15 kDa Fettsäurebindungsproteine, direkt wechselwirken.
- Verzweigketige Fettsäuren gemäß Ansprüche 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß sie die Expression lipidabbauender Enzyme und die von Lipidbindungs- und -transportproteinen verstärken.
- Proformen der verzweigketigen Fettsäuren gemäß Ansprüche 1 und 2, wie die metabolischen Vorstufen

der verzweigketigen Fettsäuren und wie die estergebundenen verzweigketigen Fettsäuren, dadurch gekennzeichnet, daß sie nach Umwandlung in die Wirkstoffe die Expression lipidabbauender Enzyme und die von Lipidbindungs- und -transportproteinen verstärken.

- Verwendung der verzweigketigen Fettsäuren und ihrer Proformen gemäß Ansprüche 1 bis 4 als Diätetikum zur Reduktion der Fettdepots.
- Verwendung der verzweigketigen Fettsäuren und ihrer Proformen gemäß Ansprüche 1 bis 4 als Diätetikum zur Vermeidung von Übergewicht.
- Applikation der verzweigketigen Fettsäuren und ihrer Proformen gemäß Ansprüche 5 und 6 als Einzelkomponenten oder im Gemisch in Kapseln, Dragees, Tabletten oder Pellets, oder als Zusatz zu festen oder flüssigen diätetischen Lebensmitteln.
- Verwendung der verzweigketigen Fettsäuren und ihrer Proformen gemäß Ansprüche 1 bis 4 als Zusatzstoffe zur Reduktion der Fettdepots.
- Verwendung der verzweigketigen Fettsäuren und ihrer Proformen gemäß Ansprüche 1 bis 4 als Zusatzstoffe zur Vermeidung von Übergewicht.
- Applikation der verzweigketigen Fettsäuren und ihrer Proformen gemäß Ansprüche 9 und 10 als Einzelkomponenten oder im Gemisch als Zusatzstoffe in Fetten, Ölen oder Fett emulsionen, wie beispielsweise Margarinen, für die menschliche Ernährung.
- Applikation der verzweigketigen Fettsäuren und ihrer Proformen gemäß Ansprüche 9 und 10 als Einzelkomponenten oder im Gemisch als Zusatzstoffe in übrigen Lebensmitteln und Materialien zur Herstellung von Lebensmitteln.
- Applikation der verzweigketigen Fettsäuren und ihrer Proformen gemäß Ansprüche 9 und 10 als Einzelkomponenten oder im Gemisch als Zusatzstoffe in Ge- nussmitteln und in Materialien zur Herstellung von Ge- nussmitteln.

Hierzu 4 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

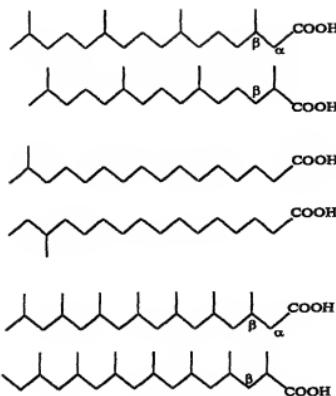


Abb. 1 Beispiele für verzweigtkettige Fettsäuren

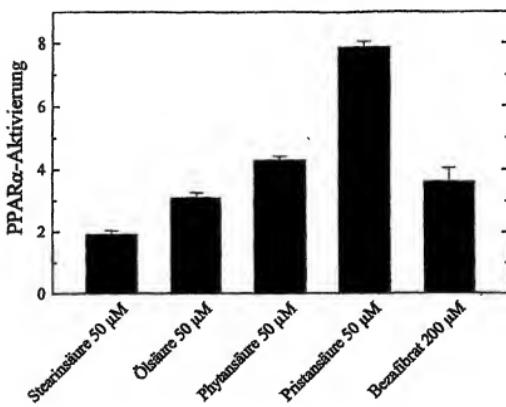


Abb. 2 Transaktivierung von humanem PPAR α in HepG2 Zellen durch Fettsäuren und Bezafibrat (n=6 \pm SD).

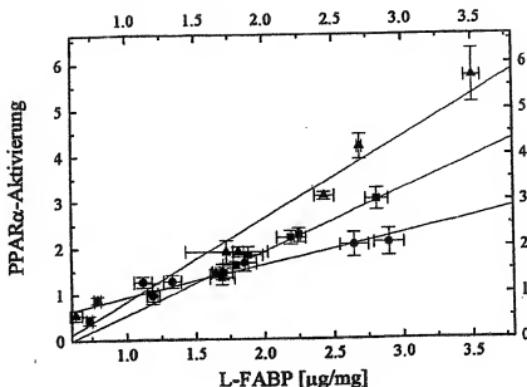


Abb. 3 Transaktivierung von humanem PPAR α in Abhängigkeit von L-FABP durch 200 μM Stearinäure (●), 50 μM Arachidonsäure (■) und 100 μM Phytansäure (▲) ($n=6 \pm \text{SD}$)

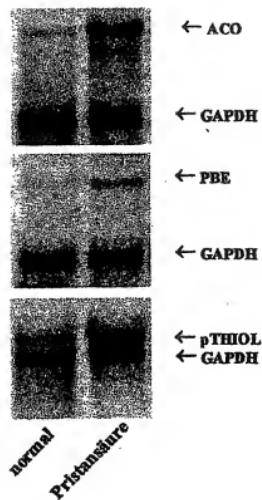


Abb. 4 Transaktivierung von Enzymen des peroxisomalen Fettsäurestoffwechsels in Pristansäure gefütterten Mäusen ($n=3 \pm SD$)